

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁶ : C12N 15/81, 1/19 // (C12N 1/19, C12R 1:645)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 95/24491 (43) Date de publication internationale: 14 septembre 1995 (14.09.95)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00269 (22) Date de dépôt international: 9 mars 1995 (09.03.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/02767 10 mars 1994 (10.03.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JACOBS, Eric [BE/FR]; 107, Grand'rue, F-67120 Dorlisheim (FR). SILVESTRE, Nathalie [FR/FR]; 2, quai du Bruckhof, F-67100 Strasbourg (FR). SCHWEINGRUBER, Ernst [CH/CH]; Schönbergweg, CH-3006 Bern (CH). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>

(54) Title: COMBINED USE OF TWO EXPRESSION CASSETTES FOR THE PRODUCTION OF A USEFUL PROTEIN

(54) Titre: USAGE COMBINÉ DE DEUX CASSETTES D'EXPRESSION POUR LA PRODUCTION D'UNE PROTÉINE D'INTÉRÊT

(57) Abstract

The invention concerns the combined use of two expression cassettes, one of which is for expressing a useful DNA fragment controlled by a thiamine-regulable promotor region, while the other is for expressing an activator gene, and the host cells used for carrying this invention. The invention also concerns an expression cassette, wherein the useful ADN fragment is controlled by a promoter region derived from the *pho-4 Schizosaccharomyces pombe* gene as well as the vectors and cells comprising such an expression cassette. A novel method for the production of a useful protein is also provided.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'usage combiné de deux cassettes d'expression, l'une permettant l'expression d'un fragment d'ADN d'intérêt placé sous le contrôle d'une région promotrice régulable par la thiamine et l'autre permettant l'expression d'un gène activateur, ainsi que les cellules hôtes dans lesquelles on met en œuvre un tel usage. La présente invention concerne également une cassette d'expression dans laquelle le fragment d'ADN d'intérêt est sous le contrôle d'une région promotrice issue du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe* et les vecteurs et cellules comprenant une telle cassette d'expression. Enfin, l'invention comprend un nouveau procédé de production d'une protéine d'intérêt.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

5

10 USAGE COMBINE DE DEUX CASSETTES D'EXPRESSION POUR LA
 PRODUCTION D'UNE PROTEINE D'INTERET.

15 La présente invention se rapporte au domaine des biotechnologies, notamment à
un perfectionnement apporté à la production d'une protéine hétérologue
d'intérêt commercial ou thérapeutique dans une cellule eucaryote et, en
particulier, une levure du genre *Schizosaccharomyces*. Elle concerne, en
premier lieu, l'usage d'un gène codant pour un produit capable d'activer une
région promotrice régulable par la thiamine, cette dernière gouvernant
20 l'expression de la protéine d'intérêt et, en second lieu, une cassette d'expression
dans laquelle le fragment d'ADN codant pour la protéine d'intérêt est placé sous
le contrôle d'une région promotrice isolée ou dérivée du gène *pho4* de
Schizosaccharomyces pombe.

25 Depuis quelques années déjà, de nombreuses cassettes d'expression pour la
production de protéines d'intérêt dans les cellules eucaryotes ont été décrites
dans la littérature. Ces cassettes comprennent notamment une région promotrice
fonctionnelle dans la cellule considérée. D'une manière générale, une région
promotrice est située dans la région 5' flanquante des gènes et comprend
30 l'ensemble des éléments permettant la transcription d'un fragment d'ADN placé
sous leur dépendance. Une région promotrice peut également être constituée par

- 2 -

l'assemblage d'éléments de diverses origines, fonctionnels dans la cellule hôte, comme notamment :

- 5 - une région promotrice minimale comprenant la TATA box et le site d'initiation de la transcription. Si elle semble nécessaire à une initiation correcte de la transcription, elle ne peut, à elle seule, assurer une transcription efficace ; et
- 10 - des régions situées en amont de la TATA box qui permettent d'assurer un niveau efficace de transcription soit de manière constitutive (niveau de transcription constant tout au long du cycle cellulaire, quelles que soient les conditions de culture) soit de manière régulable (dites régions de régulation permettant une activation de la transcription en présence d'un activateur et/ou répression de la transcription en
- 15 présence d'un répresseur), suivant le gène dont elles sont issues.

Lorsqu'on cherche à obtenir de grande quantité d'une protéine d'intérêt, on utilise généralement une région promotrice forte et constitutive pour contrôler l'expression du fragment d'ADN codant pour la protéine d'intérêt, par exemple

20 les régions 5' flanquantes des gènes PGK (3-phosphoglycérate kinase) de *Saccharomyces cerevisiae* (Hitzeman et al., 1983, Science, 219, 620-625) et *adh* (alcool déshydrogénase) de *Schizosaccharomyces pombe* (Russel et Hall, 1983, J. Biol. Chem., 258, 143-149).

25 Cependant, l'utilisation d'une région promotrice forte et constitutive n'est pas adaptée à la production de protéines d'intérêt présentant une certaine toxicité vis à vis de la cellule hôte. En effet, la production de protéines toxiques affecte la croissance des cellules et risque d'entraîner la sélection de mutations spontanées conduisant à une perte ou une réduction notable du taux de production. Dans les

30 cas extrêmes, la viabilité des cellules peut être affectée.

- 3 -

Pour ces raisons, il peut être avantageux de disposer de régions promotrices régulables permettant de faire varier la production de la protéine d'intérêt en fonction des conditions de culture ou de la phase de croissance cellulaire. D'une manière générale, de telles régions promotrices sont isolées ou dérivent de
5 gènes régulables.

Au cours de ces dernières années, un certain nombre de gènes régulables ont été mis en évidence dans de nombreux eucaryotes et notamment dans *Schizosaccharomyces pombe*. Des mécanismes très variés gouvernent la
10 régulation de ces gènes. A titre d'exemples de gènes régulables de *Schizosaccharomyces pombe*, on peut citer les gènes de "heat shock" dont l'expression augmente avec la température (Gallo et al., 1991, Mol. Cell. Biol., 11, 281-288) et le gène codant pour l'enzyme fructose biphosphatase (*fbp*) pour lequel la transcription est réprimée en présence de glucose et induite en
15 condition de carence en glucose (Hoffman et Winston, 1989, Gene, 84, 473-479). Entrent également dans cette catégorie les gènes régulables par la thiamine, à savoir les gènes *pho4* (Yang et Schweingruber, 1990, Curr. Genet., 18, 269-272), *nmt1* (Maundrell, 1990, J. Biol. Chem., 265, 10857-10864) et *thi2* (Zurlinden and Schweingruber, 1992, Gene, 117, 141-143) dont l'expression est
20 régulée au niveau transcriptionnel par la thiamine, plus précisément réprimée en présence de thiamine et induite ou déréprimée en son absence.

On a maintenant caractérisé les régions de régulation de la région promotrice du gène *pho4* impliquées dans la réponse à la thiamine et généré des cassettes
25 d'expression régulables pour la production de protéines d'intérêt dans *Schizosaccharomyces*. Les levures hébergeant une telle cassette d'expression sont cultivées dans un milieu supplémenté en thiamine lorsque la culture vise uniquement à leur propagation. Dès lors qu'une culture est entreprise en vue de produire une protéine d'intérêt, les levures sont transférées dans un milieu
30 dépourvu de thiamine. Ainsi, lorsque ces régions sont placées en amont d'un fragment d'ADN codant pour le variant Lys 47 de l'hirudine, on obtient une

- 4 -

expression efficace en l'absence de thiamine, au moins équivalente à celle détectée avec la région promotrice forte du gène *adh*. De plus, leur mise en oeuvre dans une cassette d'expression de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) a permis sa production par voie recombinante, pourtant toxique dans *Schizosaccharomyces pombe*.

On a également trouvé un gène de *Schizosaccharomyces pombe* codant pour un produit activateur agissant sur l'expression des gènes régulables par la thiamine dans des conditions inductrices (en absence de thiamine). L'amplification de ce gène, notamment par introduction dans un vecteur multicopie et transformation d'une souche de *Schizosaccharomyces pombe*, laquelle comprend également un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN codant pour une protéine d'intérêt, placé sous la dépendance d'une région promotrice régulable par la thiamine, pourrait permettre d'améliorer les niveaux de la production de la protéine d'intérêt en fonction des conditions de culture, en particulier en absence de thiamine.

Traditionnellement, la thiamine est ajoutée dans les milieux de culture des levures. Le fait de ne pas en mettre représente un coût moindre et n'affecte pas ou peu leur viabilité. Ces différents critères, qui satisfont aux conditions de production à l'échelle industrielle, illustrent les avantages de la présente invention.

Par conséquent, la présente invention a pour objet l'usage combiné en vue de la production d'une protéine d'intérêt,

- (a) d'une première cassette d'expression comportant un premier fragment d'ADN codant pour ladite protéine d'intérêt, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; lesdits éléments comprenant notamment une première région promotrice régulable par la thiamine ;
et

- 5 -

(b) d'une deuxième cassette d'expression comportant un deuxième fragment d'ADN codant pour un produit activateur des gènes régulables par la thiamine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression qui comprennent une deuxième région promotrice ; ladite deuxième cassette d'expression étant insérée (i) dans un vecteur multicopie ou (ii) dans le génome cellulaire et dans le cas (ii) caractérisé en ce que ladite deuxième région promotrice est hétérologue audit fragment d'ADN codant pour ledit produit activateur.

10

Comme indiqué précédemment, la présente invention s'applique à la production régulée par la thiamine d'une protéine d'intérêt dans une cellule eucaryote, notamment une souche de *Schizosaccharomyces* et, tout particulièrement, de l'espèce *pombe*.

15

Aux fins de la présente invention, le premier fragment d'ADN peut être issu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus. Il peut être isolé par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR (Polymerase Chain Reaction) ou synthèse chimique. D'autre part il peut coder pour une protéine d'intérêt (i) intracellulaire (ii) membranaire présente à la surface de la levure hôte ou (iii) sécrétée dans le milieu de culture. Il peut donc comprendre des éléments additionnels appropriés comme, par exemple, une séquence codant pour un signal de sécrétion. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

25

Par ailleurs, le premier fragment d'ADN peut coder pour une protéine d'intérêt correspondant à tout ou partie d'une protéine native, telle que trouvée dans la nature. Il peut également s'agir d'une protéine chimérique, par exemple provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses, ou d'un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant

30

- 6 -

peut être obtenu par les techniques de biologie moléculaire. Parmi les protéines d'intérêt au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement :

- 5 - les cytokines et notamment les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (CSF) et les facteurs de croissance ;
- 10 - les anticoagulants, de préférence l'hirudine, notamment les variants de l'hirudine décrits dans la demande européenne EP 332 523 et tout particulièrement le variant HV2 Lys 47 ;
- 15 - les enzymes telles que la trypsine et les ribonucléases ;
- les inhibiteurs d'enzymes tels que l' α 1-antitrypsine, l'antithrombine III et les inhibiteurs de protéases virales ;
- 20 - les protéines impliquées dans les canaux ioniques, telles que la protéine CFTR dont la séquence est décrite dans Riordan et al. (1989, Science, 245, 1066-1073) ;
- les protéines capables d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telles que les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple les gènes p53 et Rb ; et
- 25 - les protéines capables d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques de ces virus ou des variants altérés de protéines virales susceptibles de compétition avec les protéines virales natives.

30 Bien entendu, ces exemples ne sont pas limitatifs.

- 7 -

D'une façon générale, on aura recours pour l'expression du premier fragment d'ADN à une région promotrice fonctionnelle dans la cellule considérée et régulable par la thiamine. Cette dernière est isolée de la région 5' flanquante des gènes régulables par la thiamine, tels que ceux mentionnés précédemment. Bien
5 entendu, elle peut être modifiée par mutation, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides(s) par rapport à la région promotrice native, à la condition que ces modifications n'altèrent pas de manière drastique sa capacité de régulation. D'une façon générale, tout ou partie d'une telle région promotrice peut être utilisée dans le cadre de la présente invention. Ainsi, on peut mettre en
10 oeuvre une région promotrice d'un gène régulable par la thiamine, comprenant une région de régulation capable de conférer la régulation par la thiamine et une TATA box homologue audit gène régulable.

Selon un autre mode de réalisation, on peut employer une région de régulation
15 issue d'un gène régulable par la thiamine placée en amont d'une région promotrice minimale comprenant une TATA box d'une origine quelconque, capable d'assurer une initiation correcte de la transcription d'un premier fragment d'ADN dans la cellule considérée. L'homme du métier connaît de telles régions promotrices minimales. On peut citer à titre d'exemples celles des
20 gènes *adh* de *Schizosaccharomyces pombe* et IE1 de CMV (Cytomegalovirus) (Boshart et al., 1985, Cell, 41, 521-530).

"Région de régulation" se réfère à une séquence nucléotidique de taille variable, capable de conférer la régulation par la thiamine, c'est à dire d'induire en
25 absence de thiamine une expression du fragment d'ADN placé sous sa dépendance à un niveau notablement plus élevé qu'en présence de thiamine. Une région de régulation comprend notamment un ou des éléments d'activation et/ou de répression responsables de la régulation.

30 Bien qu'une seule région de régulation soit suffisante pour assurer une régulation par la thiamine, on peut également envisager d'employer plusieurs

- 8 -

régions de régulation en tandem pour augmenter les niveaux d'expression. Selon un usage selon la présente invention, on peut mettre en oeuvre notamment de 1 à 25 régions de régulation, avantageusement de 1 à 7 et, de préférence, de 1 à 4. Par ailleurs, la ou les région(s) de régulation peut
5 (peuvent) être insérée(s) en amont d'une région promotrice minimale dans une orientation sens ou inversée par rapport à la TATA box. De préférence, cette région de régulation est placée immédiatement en amont de la TATA box c'est à dire à une distance de 1 à 35pb, avantageusement de 1 à 20pb, de préférence de 1 à 10pb et de, manière tout à fait préférée, de 1 à 6pb.

10

On préfère tout particulièrement, mettre en oeuvre des régions promotrices issues du gène *nmt1* ou *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.

15

20

25

Dans le cadre de la présente invention, on aura, de préférence, recours à une première région promotrice issue du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*. Dans ce contexte, les inventeurs ont caractérisé une région de régulation de 40pb localisée juste en amont de la TATA box. Ainsi, selon un mode avantageux, une région de régulation en usage dans la présente invention comprend au moins 17 nucléotides de la séquence telle que montrée dans
l'identificateur de séquence NO: 2 et débutant au nucléotide en position +603 et se terminant au nucléotide en position +642. La présente invention inclut également toute séquence capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une telle séquence ainsi que son complémentaire. Bien entendu, une région de régulation au sens de l'invention peut être plus grande et comprendre
plus de séquence de la région promotrice du gène *pho4*.

30

A titre d'exemples non limitatifs, on peut envisager d'employer une région de régulation ayant une séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence NO: 2,

- 9 -

- débutant au nucléotide en position +603 et se terminant au nucléotide en position +642 ;
- 5 - débutant au nucléotide en position +593 et se terminant au nucléotide en position +642 ;
- débutant au nucléotide en position +544 et se terminant au nucléotide en position +642 ;
- 10 - débutant au nucléotide en position +496 et se terminant au nucléotide en position +642 ;
- débutant au nucléotide en position +444 et se terminant au nucléotide en position +642 ;
- 15 - débutant au nucléotide en position +255 et se terminant au nucléotide en position +642 ; ou
- débutant au nucléotide en position +1 et se terminant au nucléotide en position +642.
- 20

Une construction particulièrement intéressante est celle qui associe une région de régulation issue du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe* et une région promotrice minimale issue du gène *adh* de *Schizosaccharomyces pombe*. Cette dernière correspond à la séquence telle que publiée dans Russel et al. (1983, *supra*) et comprise entre les nucléotides -119 à -12. Il va de soit qu'elle peut comporter des modifications (mutation, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides) par rapport à la séquence publiée du moment que ces modifications ne réduisent pas d'une manière drastique sa capacité à initier la transcription.

25

30

- 10 -

D'autre part, une première cassette d'expression en usage dans la présente invention peut, en outre, contenir d'autres éléments contribuant à l'expression du premier fragment d'ADN, notamment une séquence de terminaison de la transcription telle que celle du gène *arg 3* de *Schizosaccharomyces pombe* (Van Huffel et al., 1992, Eur. J. Biochem., 205, 33-43) ainsi qu'un enhancer de transcription fonctionnel dans la cellule considérée, par exemple, l'enhancer du gène IE1 du CMV.

Une deuxième cassette d'expression en usage dans la présente invention, code pour un produit activateur capable d'activer l'expression d'un premier fragment d'ADN placé sous le contrôle d'une région promotrice régulable par la thiamine. Le terme "produit activateur" désigne un polypeptide capable d'interagir soit directement avec la région de régulation impliquée dans la régulation par la thiamine soit indirectement par l'intermédiaire de facteurs cellulaires. Il s'agit de préférence d'un produit activateur agissant au niveau transcriptionnel. Différents gènes ou parties de gènes isolés de cellules eucaryotes variées et codant pour un produit activateur de l'expression des gènes régulables par la thiamine peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention. De tels gènes activateurs peuvent être obtenus par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art et, notamment, selon la technique décrite dans l'exemple 2 par complémentation d'une cellule mutante présentant une absence de dérépression de l'expression des gènes normalement induits en absence de thiamine.

Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène issu de *Schizosaccharomyces pombe* codant pour un produit activateur ayant la séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence NO: 1 débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé en position +775 ou un variant fonctionnel dudit produit activateur. Par "variant fonctionnel", on entend un polypeptide capable d'exercer une fonction activatrice de l'expression des gènes régulables par la thiamine. De tels variants fonctionnels peuvent être

- 11 -

obtenus par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acide aminé. Ces modifications peuvent être réalisées selon les techniques classiques de biologie moléculaire. La fonctionnalité du variant ainsi obtenu peut être confirmée selon la technique indiquée dans l'exemple 2, par
5 transformation des fragments d'ADN codant pour chacun de ces variants dans des souches mutantes et mesure de la dérépression par restauration d'une activité enzymatique appropriée.

Un usage selon la présente invention, comprend le cas où la deuxième cassette
10 d'expression est comprise dans un vecteur à réplication autonome et, dans ce cas, le deuxième fragment d'ADN peut être sous la dépendance soit de sa propre région promotrice, soit d'une deuxième région promotrice hétérologue audit fragment d'ADN. Selon une autre variante, la deuxième cassette d'expression est insérée dans le génome de la cellule hôte, à la condition que le deuxième
15 fragment d'ADN soit placé sous le contrôle d'une deuxième région promotrice hétérologue audit fragment d'ADN.

S'agissant d'une deuxième région promotrice hétérologue, elle peut être constitutive ou régulable, d'une origine quelconque du moment qu'elle soit
20 fonctionnelle dans la cellule hôte. Le choix d'une telle région promotrice est à la portée de l'homme du métier. On peut, néanmoins, citer les régions promotrices des gènes *adh* et *fbp* de *Schizosaccharomyces pombe* et du gène IE1 du CMV.

Cependant, il peut être avantageux d'avoir recours à une deuxième région
25 promotrice régulable par la thiamine du type de la première région promotrice en usage dans la présente invention.

Comme précédemment, la deuxième cassette d'expression peut contenir d'autres éléments nécessaires à l'expression du deuxième fragment d'ADN tels que ceux
30 mentionnés ci-dessus.

- 12 -

Selon la variante, par ailleurs préférée, où une ou plusieurs copie(s) de la deuxième cassette d'expression est (sont) insérée(s) dans un vecteur d'expression, on emploie notamment un vecteur d'expression multicopie et, en particulier, un vecteur comprenant une ou plusieurs copie(s) de la première cassette d'expression. L'insertion de la deuxième cassette d'expression en usage dans la présente invention se fait de préférence en dehors de la première cassette d'expression proprement dite. Un tel vecteur peut comporter par ailleurs des éléments assurant sa répllication, c'est à dire une origine de répllication telle que l'origine *arsI* de *Schizosaccharomyces pombe* et, de façon optionnelle, *ori* d'*Escherichia coli*. En outre, il peut également comprendre des gènes de sélection, tels que le gène *URA3* ou *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae*, le gène *ura1* ou *leu1* de *Schizosaccharomyces pombe* ou un gène de résistance à un antibiotique. On préfère tout particulièrement mettre en usage un vecteur multicopie présent entre 20 et 500 copies dans la cellule hôte, avantageusement entre 25 et 400 copies, et de préférence entre 50 et 300 copies.

Dans le cadre de la présente invention, les premières et deuxièmes cassettes d'expression sont présentes dans une cellule hôte selon un rapport en nombre de copies de 200:1, avantageusement de 25:1, de préférence 10:1 et de manière tout à fait préférée de 1:1.

La présente invention s'étend également aux cellules hôtes dans lesquelles on met en oeuvre un usage selon la présente invention et, en particulier, aux levures sélectionnées parmi les souches suivantes *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces sloofiae*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus* et *Hasegawaea japonicus*. Un grand nombre de ces souches sont disponibles commercialement dans des organismes tels que l'AFRC (Agriculture and Food Research Council, Norfolk, UK) ou l'ATCC (Rockville, MA, USA).

- 13 -

La présente invention concerne également une troisième cassette d'expression comprenant un fragment d'ADN codant pour une protéine d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression, lesdits éléments comportant une région promotrice régulable par la thiamine issue du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*. Une telle région promotrice est définie
5 précédemment.

La présente invention s'étend également à :

- 10 (i) un vecteur d'expression comprenant une troisième cassette d'expression selon l'invention ; et
- (ii) une cellule hôte comprenant une troisième cassette d'expression ou un vecteur d'expression selon l'invention. On préfère tout particulièrement
15 une cellule de levure avantageusement du genre *Schizosaccharomyces* et, de préférence, de l'espèce *pombe*.

Enfin, la présente invention vise également un procédé de production d'une protéine d'intérêt par une cellule hôte selon l'invention, notamment une cellule
20 de *Schizosaccharomyces pombe*, selon lequel :

- on cultive dans un milieu approprié en absence de thiamine ladite cellule hôte ; et
- 25 - on récupère ladite protéine d'intérêt.

Dans le cadre de l'invention, la protéine d'intérêt peut être récupérée directement dans le milieu de culture ou après lyse des cellules selon les techniques conventionnelles. Par ailleurs, elle peut être purifiée en appliquant
30 les techniques standards connues de l'homme de l'art, par exemple et à titre indicatif, par chromatographie ou immunopurification.

- 14 -

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention. Ces exemples sont illustrés par référence aux figures suivantes :

- 5 La Figure 1 est une représentation schématique des cassettes pour l'expression du fragment d'ADN codant pour HV2 Lys 47 placé sous la dépendance d'une région promotrice régulable par la thiamine (pTG2734 et pTG2735), constitutive (pTG1757) ou non-fonctionnelle (pTG1758).
- 10 La Figure 2 est une représentation schématique d'un vecteur d'expression comportant une première cassette d'expression du variant Lys 47 de l'hirudine (HV2) sous le contrôle du promoteur *pho4* et un gène activateur (ACT) capable d'activer le promoteur *pho4*, de même qu'un origine de réplication (ars) et des gènes codant pour des marqueurs de sélection (amp et sélection).
- 15 La Figure 3 est une représentation schématique des vecteurs de délétion de la région régulatrice (UAS) du gène *pho4* (pTG4734 à pTG4738) et des vecteurs témoins (pTG2735 : région régulatrice *pho4* complète ; pTG1758 : région promotrice minimale *adh* et pTG4766 : région promotrice minimale *adh* complétée de 30pb de séquence 5' et d'un site *SaI*). La capacité de ces vecteurs à produire et sécréter l'hirudine (HV2) après culture dans un milieu dépourvu ou contenant de la thiamine (-thi ou +thi) est indiqué succinctement (+ ou -).
- 20 Les constructions décrites ci-après sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). L'ensemble des étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens est effectué par passage dans la souche *E. coli* 5K.
- 25 On utilise pour introduire les différents vecteurs dans les souches de *Schizosaccharomyces pombe* la technique à l'acétate de lithium (Ito et al., 1983,
- 30

- 15 -

J. Bacteriol., 153, 163-168). Mais toute autre technique standard peut être employée.

5 EXEMPLE 1 : Construction de vecteurs d'expression dans lesquels le gène codant pour le variant HV2 Lys 47 est placé sous le contrôle d'une région promotrice dérivée du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.

10 A. Vecteur pTG2734 dans lequel le gène HV2 Lys 47 est placé sous le contrôle de la région promotrice isolée du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.

Le plasmide pEVp11 (Russell et Nurse, 1986, Cell, 45, 145-153) contient la région promotrice du gène *adh* de *Schizosaccharomyces pombe* sous forme d'un fragment *SphI-EcoRI* de 700pb, le site *EcoRI* étant situé dans la
15 région 5' du gène *adh* 59pb en amont de l'ATG initiateur. Il est digéré par les enzymes *EcoRI* et *HindIII* et on introduit un fragment synthétique résultant de la réassociation des oligonucléotides simple brin OTG2781 et OTG2782 (décrits respectivement dans les SEQ ID NO: 3 et NO: 4) dans le
20 but de compléter la région promotrice *adh* jusqu'à 11 pb en amont de l'ATG initiateur et de créer des sites de restriction appropriés facilitant les étapes de clonage ultérieures. On génère pTG1702 dans lequel on insère en aval de la région promotrice *adh* une séquence codant pour le signal de sécrétion de la phosphatase acide majeure de *Schizosaccharomyces pombe* (*pho1*). Pour ce faire, un fragment d'ADN synthétique issu de la
25 réassociation des oligonucléotides OTG2872 et OTG2873 (SEQ ID NO: 5 et NO: 6) est ligué à pTG1702 préalablement digéré par *BamHI* et *SacI*. On obtient pTG1716.

30 Ce dernier est modifié par l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour le variant Lys 47 de l'hirudine (HV2 Lys47). pTG1716 est digéré par *MluI* et *HindIII* avant d'être ligué d'une part à un fragment synthétique présentant

des extrémités protubérantes *MluI* et *AccI* et résultant de la réassociation des oligonucléotides OTG2874 et OTG2875 (décrits respectivement dans les SEQ ID NO: 7 et NO: 8) et d'autre part à un fragment *AccI-HindIII* isolé du vecteur pTG2974. Ce dernier porte notamment un fragment
5 d'ADN codant pour HV2 Lys 47.

On complète la cassette d'expression par l'introduction en 3' du gène HV2 Lys 47 d'une séquence terminatrice de transcription correspondant à la région 3' du gène *arg3* de *Schizosaccharomyces pombe*. Un fragment *HpaI-ClaI* de 0,92 kb est isolé de pCVH3 (Van Huffel et al., 1992, Eur J. Biochem., 205, 33-43) puis traité au fragment Klenow de l'ADN polymérase. Ce fragment comporte les derniers codons du gène *arg3* de *Schizosaccharomyces pombe* suivis de la séquence de terminaison de la transcription. Il est inséré dans pTG1702 digéré par *HindIII* et dont les
10 extrémités ont été rendues franches par traitement au fragment Klenow de l'ADN polymérase, pour donner pTG1746.

pTG1746 est digéré par *XbaI*, traité au fragment Klenow de l'ADN polymérase avant d'être digéré par *BamHI*. Le fragment comportant les séquences de terminaison de la transcription est introduit dans le vecteur
20 pDW230 digéré par *EcoRI*, soumis à un traitement au fragment Klenow de l'ADN polymérase puis digéré par *BamHI*. On obtient pTG1751.

Le vecteur pDW230 est similaire à pDW232 décrit dans la littérature (Weilguny et al., 1991, Gene, 99, 47-54). Ils dérivent tous deux de pGEM3 dans lequel on a inséré une origine de répllication fonctionnelle dans *Schizosaccharomyces pombe* (origine *arsI*) ainsi que le gène *ura4* de *Schizosaccharomyces pombe* en tant que marqueur de sélection ; à la différence que l'introduction du fragment portant l'origine *arsI* au niveau
25 du site *NaeI* de pGEM3, donnant lieu à pDW230, a entraîné une délétion de ce site jusqu'à la base 2862.

- 17 -

Le fragment *SphI-SacI* comportant la région promotrice *adh* suivie de la séquence codant pour le signal de sécrétion *pho1* et HV2 Lys 47 est isolé de pTG1722. Il est ensuite sous-cloné entre les mêmes sites de pTG1751. Il en résulte pTG1757 dans lequel l'expression de HV2 Lys 47 est contrôlée par la région promotrice *adh* et est donc constitutive (Figure 1).

D'autre part, la région promotrice du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe* est obtenue par PCR (Polymérase Chain Reaction) à partir du clone pSp4B (Yang and Schweingruber, 1990, Current Genet., 18, 269-272) et à l'aide des amorces OTG3569 comportant un site *SphI* (SEQ ID NO: 9) et OTG3239 muni d'un site *BamHI* (SEQ ID NO: 10).

Le fragment *SphI-BamHI* ainsi généré est substitué au fragment *SphI-BamHI* portant la région promotrice *adh* de pTG1757 pour donner pTG2734 (Figure 1).

B. Construction de vecteurs d'expression de HV2 Lys 47 comprenant une région promotrice hybride "*pho4-adh*" et caractérisation des régions du gène *pho4* impliquées dans la régulation par la thiamine.

On isole par PCR et à partir du vecteur pTG2734, un fragment de 642 pb comportant les séquences 5' flanquantes du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe* situées en amont de la TATA box. On met en oeuvre les amorces OTG3569 (SEQ ID NO: 9) et OTG3210 (SEQ ID NO: 11).

Le fragment PCR *SphI-NcoI* ainsi obtenu, est introduit dans pTG1757 digéré par les mêmes enzymes pour donner pTG2735 (Figure 1).

30

Afin de localiser les régions régulatrices du gène *pho4* responsables de la régulation par la thiamine, un certain nombre de fragments PCR ont été générés à partir de pTG2734 et de l'amorce OTG3210 précédemment décrite combinée à l'une des amorces suivantes (voir tableau 1) :

5

Tableau 1

Amorces	Vecteur d'expression	Taille de la région 5' <i>pho4</i> synthétisée
OTG4645 (SEQ ID NO: 12)	pTG4734	50 pb
OTG4646 (SEQ ID NO: 13)	pTG4735	99 pb
OTG4647 (SEQ ID NO: 14)	pTG4736	147 pb
OTG4648 (SEQ ID NO: 15)	pTG4737	199 pb
OTG4649 (SEQ ID NO: 16)	pTG4738	388 pb

10

15

Chacun des fragments PCR *SphI-NcoI* généré est sous cloné comme précédemment dans le vecteur pTG1757 traité par les mêmes enzymes. Une représentation schématique de ceux-ci fait l'objet de la Figure 3.

20

Enfin, on génère le vecteur pTG5701 par introduction dans pTG1757 d'un fragment d'ADN muni d'extrémités *SphI* et *NcoI* et provenant de la réassociation des oligonucléotides OTG4924 et OTG4925 (SEQ ID NO: 17 et 18). Ainsi dans pTG5701, l'expression de HV2 Lys 47 est placée sous le contrôle d'une région de régulation de 40 pb du gène *pho4* précédant la TATA box du gène *adh*.

25

C. Construction d'un vecteur d'expression de HV2 Lys 47 comprenant une région promotrice hybride "*pho4-adh*" et dans laquelle la région de régulation *pho4* est en orientation anti-sens par rapport à la TATA box du gène *adh*.

30

Le vecteur pTG4734 est digéré par *SphI* et *NcoI* puis traité à l'ADN polymérase T4 puis reliqué. On vérifie par séquençage selon les méthodes traditionnelles, les clones comportant une copie d'une région de régulation du gène *pho4* de 50 pb mais en orientation reverse par rapport au vecteur d'origine pTG4734 et donc à la TATA box du gène *adh*.

D. Construction de vecteurs d'expression de HV2 Lys 47 comprenant une région promotrice hybride "*pho4-adh*" incluant plusieurs régions de régulation *pho4* de 50 pb en tandem.

Un fragment d'ADN correspondant à une région de régulation du gène *pho4* de 50 pb muni à ses deux extrémités d'un site de restriction *BglI*, est généré par réassociation des oligonucléotides OTG5296 et OTG5297 (SEQ ID NO: 19 et 20). L'étape de réhybridation des deux oligonucléotides est suivie d'une étape de ligation puis d'un traitement à l'ADN polymérase de T4. Le mélange réactionnel est ensuite ligué au vecteur pTG1757 (en remplacement du fragment correspondant) préalablement digéré par *SphI* et *NcoI* et traité à l'ADN polymérase de T4. On vérifie par séquençage, dans les clones obtenus, le nombre d'"unités" de 50 pb de *pho4* ainsi que leur orientation. C'est ainsi que l'on génère pTG8607, pTG8608 et pTG8609 comportant respectivement 1, 2 et 3 copies de région de régulation de 50 pb en orientation anti-sens par rapport à la TATA box du gène *adh*.

EXEMPLE 2 : Construction de vecteurs d'expression du gène HV2 Lys 47 comportant en outre le gène activateur de *Schizosaccharomyces pombe*.

A. clonage du gène activateur de *Schizosaccharomyces pombe*.

Le gène codant pour un produit activateur capable d'activer l'expression des gènes régulables par la thiamine est isolé par complémentation d'une

- 20 -

souche mutante de *Schizosaccharomyces pombe* présentant une absence de
dérépression de l'expression du gène *pho4* en l'absence de thiamine. On
isole des fragments génomiques partiellement digérés par *Sau3A* d'une
souche de *Schizosaccharomyces pombe* de type sauvage. Ils sont clonés
5 dans le site *Bam*HI du vecteur pUR19 (Barbet et al., 1992, *Gene*, 114, 59-
66) puis introduits dans la souche mutante *thi1-23 ura4 D18 pho1-44*
(Schweingruber et al., 1992, *Genetics*, 130, 445-449).

Les transformants sont sélectionnés pour la prototrophie pour l'uracile et le
10 5-(2 hydroxyethyl)-4-méthylthiazole (Zurlinden et Schweingruber, 1992,
Gene, 117, 141-143). 14 transformants sont obtenus et leur ADN
plasmidique est isolé selon le protocole décrit dans Moreno et al. (1991,
Methods in Enzymology, 194, 795-823). L'ADN est ensuite amplifié dans
Escherichia coli selon les méthodes standards (Maniatis et al., 1982,
15 *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, NY). Quatre transformants présentent un insert de 4
kb qui, après transformation dans la souche mutante précédente, est
capable de supprimer l'absence de dérépression. Ceci se traduit par la
restauration d'une activité phosphatase acide dans un milieu dépourvu de
20 thiamine, mesurée selon la technique décrite dans Schweingruber et al.
(1986, *J. Biol. Chem.*, 261, 15877-15882). Il est donc probable que l'insert
de 4 kb comprenne un gène activateur de l'expression des gènes régulables
par la thiamine *nmt1* et *pho4*.

25 On détermine la séquence de la majorité de l'insert selon les techniques
conventionnelles connues de l'homme de l'art. Les données permettent de
mettre en évidence un cadre de lecture ouvert de 775 résidus dont la
séquence est reportée dans l'identificateur de séquence NO :1 (SEQ ID
NO :1).

30

B. *Usage combiné du gène activateur de Schizosaccharomyces pombe et d'une cassette d'expression de HV2 Lys 47 sous le contrôle d'une région promotrice issue du gène pho4.*

5 Le fragment *SphI-EcoRI* est isolé du plasmide pUR19 comprenant l'insert de 4 kb et traité par l'ADN polymérase T4 avant d'être introduit dans des vecteurs d'expression réplcatifs multicopies de *Schizosaccharomyces* comportant une cassette d'expression contrôlée par le promoteur *pho4* et des marqueurs de sélection appropriés. Un vecteur de ce type est représenté
10 dans la Figure 2.

C. *Usage combiné du gène activateur de Schizosaccharomyces pombe et d'une cassette d'expression de HV2 Lys 47 sous le contrôle d'une région promotrice issue du gène nmt1.*

15 On génère un fragment PCR de 188 pb à partir de l'ADN génomique isolé d'une souche de *Schizosaccharomyces pombe* par les techniques conventionnelles. On utilise les oligonucléotides OTG5217 et OTG3028 (décrits respectivement dans les SEQ ID NO : 21 et 22). On introduit le
20 fragment *SphI* et *BamHI* ainsi généré entre les mêmes sites du vecteur pTG1757. On obtient le vecteur pTG5774.

Le fragment d'ADN codant pour le produit activateur est inséré dans un vecteur réplcatif multicopie de *Schizosaccharomyces* comportant
25 notamment une cassette d'expression contrôlée par le promoteur *nmt1*.

EXEMPLE 3 : Production de HV2 Lys 47 en fonction du plasmide utilisé.

Les vecteurs d'expression des exemples 1 et 2 sont introduits dans une souche
30 de *Schizosaccharomyces* et on évalue le niveau d'expression du fragment d'ADN codant de l'hirudine selon la méthodologie mentionnée ci-dessous.

- Une souche de *Schizosaccharomyces pombe*, par exemple la souche D18 disponible à l'AFRC sous la référence 2036, est transformée par les vecteurs d'expression précédemment cités. On utilise à titre de contrôle négatif la même souche transformée en parallèle par le vecteur pTG1758 (Figure 1) comportant
- 5 une région promotrice tronquée réduite à la région promotrice minimale du gène *adh*. Le contrôle positif d'expression est constitué par pTG1757 permettant une expression constitutive de HV2 Lys 47, sous le contrôle de la région promotrice du gène *adh*.
- 10 Les souches transformées sont cultivées dans un milieu Kappeli supplémenté avec 2% de glucose et un mélange de vitamines comprenant notamment de la thiamine à une concentration finale de 0,002g/l (milieu thi+). Lorsque les cultures atteignent une DO (densité optique) à 600nm comprise entre 1 et 2, elles sont diluées à une DO d'environ 0,05 soit dans du milieu thi+ de
- 15 composition telle qu'indiquée ci-dessus, soit dans un milieu Kappeli supplémenté avec 2% de glucose et un mélange de vitamines dépourvu en thiamine (milieu thi-). Des aliquotes de culture sont prélevées régulièrement durant la phase exponentielle de croissance ainsi qu'en fin de croissance (DO 600nm comprise entre 7 et 9).
- 20 On détermine pour chaque échantillon prélevé, la quantité d'hirudine sécrétée dans le milieu de culture. Bien qu'il soit possible de doser l'hirudine par toutes les techniques conventionnelles, on utilise la technique ELISA telle que décrite dans Koch et al., (1993, Analytical Biochemistry, 214, 301-312) en mettant en
- 25 oeuvre le couple d'anticorps monoclonaux MATG102 et MATG106 et, de l'hirudine titrée comme décrit dans la référence précitée. Par ailleurs, on peut également évaluer le niveau d'expression de l'hirudine par analyse Northern des ARNm isolés des cellules de *Schizosaccharomyces pombe*. On met en oeuvre une sonde capable de s'hybrider spécifiquement avec les séquences codant pour
- 30 HV2 Lys 47, par exemple une sonde issue du fragment *AccI-SacI* de pTG1757. Mais d'autres sondes, telles que des oligonucléotides, peuvent être employées.

La tableau 2 résume les niveaux d'hirudine sécrétée par *Schizosaccharomyces pombe* transformée par chacun des plasmides indiqués et selon que le milieu de culture contient de la thiamine ou non (thi+ ou thi-) (voir également Figure 3).

5

Tableau 2

	Vecteur	Région 5'	Orientation	TATA box	Niveau de HV2 Lys47	
		<i>pho4</i>			thi+	thi-
	pTG1757	-	-	<i>adh</i>	+++	+++
10	pTG1758	-	-	<i>adh</i>	-	-
	pTG5701	40pb	sens	<i>adh</i>	-	++ à +++
	pTG4734	50pb	sens	<i>adh</i>	-	+++
	pTG4735	99pb	sens	<i>adh</i>	-	+++
	pTG4736	147pb	sens	<i>adh</i>	-	+++
15	pTG4737	199pb	sens	<i>adh</i>	-	+++
	pTG4738	388pb	sens	<i>adh</i>	-	++
	pTG2735	642pb	sens	<i>adh</i>	-	+++
	pTG2734	642pb	sens	<i>pho4</i>	-	+++
20	pTG4770	50pb	antisens	<i>adh</i>	-	+++

Des estimations de la quantité d'ARNm HV2 Lys 47 par Northern blot confirment ces résultats.

- 25 D'autre part, lorsqu'on analyse par Northern blot les ARNm présents dans les cellules de *Schizosaccharomyces pombe* transformées par pTG8607, pTG8608 ou pTG8609 et cultivées en présence de thiamine, on ne peut détecter de signal d'hybridation. Par contre lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu dépourvu de thiamine, on observe une forte augmentation de la quantité
- 30 d'ARNm HV2 Lys 47. L'intensité du signal d'hybridation corrèle le nombre de copies de la séquence *pho4* de 50 pb.

- 24 -

L'ensemble de ces résultats montre qu'en présence de thiamine, l'expression du gène d'intérêt est réprimée alors qu'en son absence on observe une forte induction, se traduisant par la présence d'une quantité importante d'hirudine sécrétée dans le milieu de culture.

5

D'autre part, ces expériences ont permis d'identifier une région de régulation, que l'on peut qualifier de minimale, comprise dans la région promotrice du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe* et responsable de la régulation par la thiamine. Cette région de 40 à 50 pb est située en amont de la TATA box et est
10 suffisante, à elle seule, pour conférer une telle régulation (répression en présence de thiamine et dérépression en absence de thiamine). Le fait que cette région fonctionne quelle que soit son orientation vis à vis de la TATA box est inattendu.

15 Enfin, la présence de plusieurs copies de cette région minimale en amont d'une TATA box a un effet synergique sur le niveau d'expression, effet qui semble corrélér le nombre de copies de cette région.

EXEMPLE 4 : Construction d'un vecteur d'expression de la protéine CFTR sous
20 le contrôle d'une région promotrice hybride "*pho4-adh*".

Le vecteur pTG5960, issu du p poly III-I* (Lathe et al., Gene, 1987, 57, 193-201) et modifié par l'insertion de la séquence codant pour la protéine CFTR humaine dont la séquence en acide aminé est divulguée dans Riordan et al
25 (1989, *supra*), est digéré par les enzymes *AvaI* et *XhoI*. Le fragment *AvaI-XhoI* comprenant la séquence nucléotidique codant pour la protéine CFTR est traité par le grand fragment Klenow de l'ADN polymérase et inséré dans le vecteur d'expression de *Schizosaccharomyces pombe* pTG2735 digéré par *SacI* et *BamHI* et traité par l'ADN polymérase T4. On génère pTG5999.

30

- 25 -

Le fragment *AvaI-XhoI*-Klenow est introduit en parallèle dans le vecteur pTG1702 digéré par *Bam*HI et traité au grand fragment Klenow de l'ADN polymérase pour donner pTG1753 (expression constitutive du gène CFTR sous le contrôle de la région promotrice du gène *adh* de *Schizosaccharomyces pombe*).

Après transformation de *Schizosaccharomyces pombe* D18 par pTG1753, aucun transformant ne produit de protéine CFTR. L'analyse par cartographie de restriction montre que les plasmides isolés des transformants sont réarrangés, par exemple au niveau de la séquence CFTR. Ces résultats indiquent que l'expression de la protéine CFTR est probablement toxique pour les cellules.

Après introduction de pTG5999 dans la souche *Schizosaccharomyces pombe* D18 selon le protocole indiqué précédemment, les transformants sont cultivés en présence ou en absence de thiamine. Des aliquotes de cellules sont prélevées au cours du temps et la production de la protéine CFTR déterminée par Western blot (Dalemans et al., 1992, Experimental Cell Research, 201, 235-240). Aucun signal n'apparaît dans les cultures placées dans un milieu thi+ (répression de l'expression due à la présence de thiamine), alors qu'on détecte une bande ayant la masse moléculaire attendue dans les cultures réalisées en absence de thiamine.

Ces résultats montrent l'utilité de la région promotrice issue du gène *pho4* pour la production de protéines toxiques.

25

EXEMPLE 5 : Influence de la position de la région 50pb du gène *pho4* responsable de la régulation par la thiamine par rapport à la TATA box.

Afin de déterminer si la proximité de cette région vis à vis de la TATA box est requise pour les fonctions d'activation et de répression, elle a été clonée à deux autres positions plus éloignées de la TATA box *adh*.

30

- 26 -

Le plasmide pTG6726 est obtenu par digestion de pTG4734 par l'enzyme de restriction *NcoI*, traitement à l'ADN polymérase du phage T4 et ligation. Dans ces conditions, l'unité 50pb *pho4* se trouve séparé par 10pb de la TATA box du gène *adh*.

5

Le vecteur pTG5786 provient du clonage du fragment *SphI-NcoI* isolé de pTG4734 et portant l'unité 50pb *pho4* dans le site *SalI* du pTG4766, après traitement par l'ADN polymérase T4. De ce fait, après ligation la distance séparant l'unité 50pb de la TATA box *adh* est de 40 pb. Le plasmide pTG4766

10 dérive du pTG1757 par introduction d'un site *SalI* 30pb en amont de la TATA box *adh*. Cette modification n'a aucun effet sur l'activité du promoteur *adh* et la délétion des séquences situées en amont du site *SalI* (tel que réalisé dans le pTG4766) inhibe l'activité promotrice (comportement comparable à pTG1758).

15 Enfin le vecteur pTG5787 a été construit d'une manière similaire à la différence que l'unité 50pb *pho4* est cloné dans l'orientation inverse. Dans ce cas l'éloignement par rapport à la TATA box est de 36pb.

Les plasmides pTG6729, pTG5786 et pTG5787 ont été introduits dans la levure

20 D18. Après culture en présence ou en absence de thiamine, les transcrits synthétisés par ces différents transformants ont été analysés par Northern-blot. La quantité de transcrits présents dans la souche transformée avec le pTG6729, en absence de thiamine, est inférieure à celle obtenue avec la souche portant le plasmide pTG4734, mais, en présence de thiamine, la répression est conservée.

25 En ce qui concerne les souches transformées avec les plasmides pTG5786 et pTG5787 l'efficacité de transcription est comparable quelles que soient les conditions de culture (plus ou moins thiamine), et elle est semblable à celle mesurée dans la souche portant le pTG4734 en absence de thiamine.

- 27 -

Ainsi, l'éloignement de 10pb de l'unité 50pb par rapport à la TATA box *adh* diminue sa capacité à activer la transcription, mais ne modifie pas la répression par la thiamine. Par contre, lorsque celle-ci se trouve éloignée de 40pb de la TATA box, ses propriétés d'activation restent intactes mais elle devient
5 incapable de réprimer la transcription.

Il apparait que la proximité entre la région régulatrice de 50pb du gène *pho4* et la TATA box est nécessaire pour que la répression par la thiamine soit efficace.

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Transgene S.A.
(B) RUE: 11 rue de Molsheim
(C) VILLE: Strasbourg
(D) PROVINCE: France
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 67082
(G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
(H) TELECOPIE: (33) 88 22 58 07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Usage combiné de deux cassettes d'expression pour la production d'une protéine d'intérêt

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 22

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 775 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: *Schizosaccharomyces pombe*

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met Asn Glu Glu Ile Gly Phe Leu Lys Asn Gln Leu Phe Ala Asp Val
1 5 10 15

Lys Asp Leu Glu Arg Lys Lys Lys Arg Arg Val Pro Pro Glu Gln Arg
20 25 30

Arg Arg Val Phe Arg Ala Cys Lys His Cys Arg Gln Lys Lys Ile Lys
35 40 45

Cys Asn Gly Gly Gln Pro Cys Ile Ser Cys Lys Thr Leu Asn Ile Glu
50 55 60

Cys Val Tyr Ala Gln Lys Ser Gln Asn Lys Thr Leu Ser Arg Glu Tyr
65 70 75 80

- 29 -

Leu Glu Glu Leu Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Glu Tyr Ile Phe Ser
 85 90 95
 Arg Met Cys Pro Asn Phe Asn Leu Glu Thr Lys Asn Leu Ile Ser Ile
 100 105 110
 Ser Lys Lys Leu Ser Glu Asn Glu Asn Leu Pro Val Ser Lys Ile Ala
 115 120 125
 Glu Val Thr Asn Glu Leu Asp Thr Leu Val Arg Ile Asn Asp Gln Leu
 130 135 140
 Ser Arg Asn His Ile Ser Gly Thr Thr Glu Glu Met Gln Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Ser Leu Ile Ala Gly Glu Val Gln Pro Gly Ile Ser Phe Arg Asp Gln
 165 170 175
 Leu Lys Val Gly Lys Leu Glu Asp Thr Leu Tyr Leu Gly Pro Thr Thr
 180 185 190
 Ser Glu Ala Phe Ile Glu Arg Leu Gln Asn Glu Leu Glu Leu Glu Ser
 195 200 205
 Ile Ser Glu Asp Asp Leu Tyr Ser Lys Arg Leu Ser Pro Ser Val Ser
 210 215 220
 Tyr Ser Glu Phe Asp Glu Gln Leu Leu Leu His Ala Arg Ser Leu Ile
 225 230 235 240
 Pro Ser Lys Ala Val Val Glu Phe Leu Ile Asn Ser Phe Phe Ile Asn
 245 250 255
 Val Gln Thr Asn Leu Phe Val Tyr His Pro His Phe Phe Lys Cys Arg
 260 265 270
 Leu Glu Ile Phe Leu Ala Met Glu Asn Gln Ile Asp Ala Gly Phe Leu
 275 280 285
 Cys Ile Leu Leu Met Val Leu Ala Phe Gly Asn Gln Tyr Thr Ala Glu
 290 295 300
 Gln Gln Glu Asp Val Ser Lys Ser Asn Phe His Ala Ser Asn Ile Gly
 305 310 315 320
 Asn Arg Leu Phe Ser Ala Ala Leu Ser Ile Phe Pro Leu Val Leu Leu
 325 330 335
 Gln Ser Asp Val Ser Ala Val Gln Ser Ser Leu Leu Ile Gly Leu Tyr
 340 345 350
 Leu Gln Ser Thr Ile Tyr Glu Lys Ser Ser Phe Ala Tyr Phe Gly Leu
 355 360 365
 Ala Ile Lys Phe Ala Val Ala Leu Gly Leu His Lys Asn Ser Asp Asp
 370 375 380
 Pro Ser Leu Thr Gln Asn Ser Lys Glu Leu Arg Asn Arg Leu Leu Trp
 385 390 395 400
 Ser Val Phe Cys Ile Asp Arg Phe Val Ser Met Thr Thr Gly Arg Arg
 405 410 415

- 30 -

Pro Ser Ile Pro Leu Glu Cys Ile Ser Ile Pro Tyr Pro Val Ile Leu
 420 425 430
 Pro Asp Leu Glu Ile Pro Gly Ser Gln Ser Ile Val Glu Asn Met Arg
 435 440 445
 Ala Val Ile Asn Leu Ala Lys Leu Thr Asn Glu Ile Cys Asp Ser Leu
 450 455 460
 Tyr Trp Asn Pro Ser Pro Ser Phe Glu Ser Gln Val Asn Ser Val Arg
 465 470 475 480
 Arg Ile Tyr Ala Arg Leu Glu Leu Trp Lys Ser Asp Leu His Ser Ser
 485 490 495
 Val Val Phe Asp Glu Ser Ala Val Gln His Pro Leu Phe Arg Ser Asn
 500 505 510
 Ala His Val Gln Met Ile Tyr Asp Asn Ala Ile Met Leu Thr Thr Arg
 515 520 525
 Val Ile Met Val Lys Lys Leu Lys Asp Lys Asp Leu Thr Ala Glu Asn
 530 535 540
 Arg Arg Tyr Ile Gln Leu Cys Val Glu Ser Ala Thr Arg Val Ile Asn
 545 550 555 560
 Ile Ala His Leu Leu Leu Thr His Lys Cys Leu Ser Ser Leu Ser Phe
 565 570 575
 Phe Gly Leu His Val Pro Phe Ala Ser Ala Pro Ile Leu Leu Leu Ser
 580 585 590
 Leu His Tyr Glu Asn Ser Gln Asp Ile Gln Ala Val Val Thr Lys Leu
 595 600 605
 Trp Gln Val Leu Glu Phe Leu Ser Ser Arg Cys Glu Phe Ala Arg Glu
 610 615 620
 Ser Leu Asn Tyr Leu Lys Ser Phe Asn Lys Gln Leu Ser Arg Arg Asn
 625 630 635 640
 Ala Pro Asp Ile Asn Asn Pro Ile Ala Asp Phe Gln Asn Ser Phe Gln
 645 650 655
 Asn Trp Gln Ser Trp Val Gly Asp Met Ser His Gly Asp Met Leu Ser
 660 665 670
 Thr Phe Lys Leu Thr Gly Glu Ser Ser Asn Gly Ser Asn Ser Thr Pro
 675 680 685
 Asn Glu Ala Phe Gln Pro Phe Asp Gln Thr Ser Ser Leu Tyr Asn Val
 690 695 700
 Pro Gly Leu Asn Lys Ser Tyr Val Ser Asn Gln Pro Ser Leu Leu Thr
 705 710 715 720
 Pro Glu Thr Phe Leu Pro Asp Pro Val Leu Asn Leu Glu Val Asp Lys
 725 730 735
 Gln Trp Thr Ala Pro Thr Phe Leu Ser Trp Thr Glu Leu Leu Gly Pro
 740 745 750

- 31 -

Thr Asn Val Ser Glu Gln Ser Ser His Thr Ala Glu Gln Thr Ser Asn
755 760 765

Leu Thr Leu Glu Lys Asn Gly
770 775

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 642 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: gene pho4 de Schizosaccharomyces pombe

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CTAATAAATT	AAATTGTTGG	ATCTTACTAA	AGACTAAATA	TTAATAATAA	TTTTCTCCCA	60
AGCTATTTAT	ATACATATTA	GAAGCAATTT	GCAAAGATAG	CAGACTAATA	CTCTTCAATG	120
CCCAACTTCT	TATTAGTGAT	ATACATGTAA	AAATATCTTT	ATTATGCAAT	ATTATGTAGC	180
AGCTCGTACA	ATGTTTGCAC	ATCTTTACAC	AATAGTATTC	ATTTTGTATT	ACATTATCAT	240
TTATAATTCC	ATTTACAGAG	GAGTAGGCAT	TGCTATTATA	TAATATAAAT	TTATATAAAA	300
CAAAAAGACT	GCAAAATCAT	TTCCAACCTGA	AACTTCGTTT	TTTAGTTCTA	TTAAATTATT	360
AAGTATTGGA	ATATCAGATT	TTTGTAAGTT	CAGTAATAAT	AATATCATT	TATTACACCG	420
TTGTATTATT	AATCGCATAA	TATTACTGTA	ACACTTTGTC	CGTAATTTGC	ATCGTTATTT	480
CAGTTAACAA	TTGTGGGTCC	AAAATCTTAA	AGTCTAATAG	CGAACTACAC	CAGGTTTGCA	540
ACTTCATTCA	TTTTTTTTAA	TTCCAATGTA	GTCGTGCCGA	AATCAGACTT	TGGTTTGGTG	600
GTAGCCGGGG	TGCTTAGTGT	TAGCAGATAT	CCGGATTGAT	TG		642

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 79 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- 32 -

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique OTG2781

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AATTCCATTG TCTTGACTAT CACAACTTT TAAGTCTTTT CTTTTTGGG TCCACACCAT 60
GGAGCTCCCG GGAGATCTA 79

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 79 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG2782)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AGCTTAGATC TCCCGGGAGC TCCATGGTGT GGATCCAAAA AAGAAAAGAC TTAAAAGTTT 60
GTGATAGTCA AGACAATGG 79

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 74 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG2872)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GATCCAACCA CATAATGTTT TTGCAAAATT TATTCCTTGG CTTTTTGGCC GTCGTTTGTG 60
CCAACGCGTG AGCT 74

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases

- 33 -

- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG2873)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CACGCGTTGG CACAAACGAC GGCCAAAAAG CCAAGGAATA AATTTTGCAA GAACATTATG 60
TGGTTG 66

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 11 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG2874)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CGCGATTACG T 11

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 9 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG2875)

- 34 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

ATACGTAAT

9

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG3569)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TTTGGGCATG CGTCTTTTGA TGCTAAATAA ATTAAATTGT TGG

43

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG3239)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GAGAAATACC ACTTAACTTC ATGGATCCCG AGAAAAACA ATG

43

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 35 -

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG3210)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCAAACCAT GGCAATCAAT CCGGATATCT GCTAAC

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4645)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

AAACAAGCAT GCGTTTGGTG GTAGCCGGGG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4646)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

AAACAAGCAT GCTCATTCAT TTTTTTTAAT TCCAATGTAG

40

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 36 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4647)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

AAACAAGCAT GCGGTCCAAA TCTTAAAGTC TAATAGCG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 39 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4648)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

AAACAAGCAT GCTACTGTAA CACTTTGTCC GTAATTTGC

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 35 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4649)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AAACAAGCAT GCCACAGAGA GTAGGCATTG CTATT

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

- 37 -

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4924)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CAGCCGGGGT GCTTAGTGTT AGCAGATATC CGGATTGATT GC

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 50 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG4925)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CATGGCAATC AATCCGGATA TCTGCTAACA CTAAGCACCC CGGCTGCATG

50

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 72 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG5296)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CGGCCCATGG TTTGGTGGTA GCCGGGGTGC TTAGTGTTAG CAGATATCCG GATTGATTGC

60

CATGGGCCTC TC

72

- 38 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 72 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG5297)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AGGCCCATGG CAATCAATCC GGATATCTGC TAACACTAAG CACCCCGGCT ACCACCAAAC 60
CATGGGCCCGG AG 72

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG5217)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CCCAAAGCAT GCAAGCTTAA AGGAATCCGA TTGTCATTC 39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide synthetique (OTG3028)

- 39 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ATCTTGTTAG TAGCCATGGA TCGATTAA CAAAGCG

37

Revendications

1. Usage combiné en vue de la production d'une protéine d'intérêt,
 - 5 (a) d'une première cassette d'expression comportant un premier fragment d'ADN codant pour ladite protéine d'intérêt, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; lesdits éléments comprenant notamment une première région promotrice régulable par la thiamine ; et
 - 10 (b) d'une deuxième cassette d'expression comportant un deuxième fragment d'ADN codant pour un produit activateur des gènes régulables par la thiamine, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression qui comprennent une deuxième région promotrice ; ladite deuxième cassette d'expression étant insérée (i) dans un vecteur multicopie ou (ii)
 - 15 dans le génome cellulaire et dans le cas (ii) caractérisé en ce que ladite deuxième région promotrice est hétérologue audit fragment d'ADN codant pour ledit produit activateur.
2. Usage selon la revendication 1, selon lequel ladite première cassette
20 d'expression et ladite deuxième cassette d'expression sont présentes selon un rapport en nombre de copies de 200:1, avantageusement de 25:1, de préférence 10:1 et, de manière tout à fait préférée, de 1:1.
3. Usage selon la revendication 1 ou 2, selon lequel le deuxième fragment
25 d'ADN code pour un produit activateur ayant la séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence NO: 1 débutant à l'acide aminé en position +1 et se terminant à l'acide aminé en position +775 ou un variant fonctionnel dudit produit activateur.
- 30 4. Usage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, selon lequel ladite deuxième région promotrice est hétérologue audit fragment d'ADN codant pour ledit produit activateur et régulable par la thiamine.

- 41 -

5. Usage selon la revendication 4, selon lequel les première et/ou deuxième régions promotrices régulables par la thiamine sont issues des gènes sélectionnés parmi le groupe constitué par les gènes *pho4* et *nmt1* de *Schizosaccharomyces pombe*.
5
6. Usage selon la revendication 5, selon lequel les première et/ou deuxième régions promotrices régulables par la thiamine sont issues du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.
10
7. Usage selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, selon lequel les première et/ou seconde régions promotrices régulables par la thiamine comprennent au moins une région de régulation conférant la régulation par la thiamine, ladite région de régulation étant placée en amont d'une région promotrice minimale.
15
8. Usage selon la revendication 7, selon lequel ladite région de régulation est placée immédiatement en amont de la TATA box d'une région promotrice minimale.
20
9. Usage selon la revendication 7 ou 8, selon lequel les première et/ou deuxième régions promotrices régulables par la thiamine comprennent de 1 à 25, avantageusement de 1 à 7, et de préférence, de 1 à 4 régions de régulation.
- 25 10. Usage selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la ou les région(s) de régulation est (sont) dans une orientation sens ou anti-sens par rapport à ladite région promotrice minimale.
- 30 11. Usage selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, selon lequel la ou les région(s) de régulation est (sont) issue(s) du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.

- 42 -

12. Usage selon la revendication 11, selon lequel la région de régulation comprend au moins 17 nucléotides d'une séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence NO: 2 et débutant au nucléotide en position +617 et se terminant au nucléotide en position +642.

5

13. Usage selon la revendication 12, selon lequel la région de régulation à la séquence telle que montrée dans l'identificateur de séquence NO: 2

10 - débutant au nucléotide en position +603 et se terminant au nucléotide en position +642 ;

- débutant au nucléotide en position +593 et se terminant au nucléotide en position +642 ;

15 - débutant au nucléotide en position +544 et se terminant au nucléotide en position +642 ;

- débutant au nucléotide en position +496 et se terminant au nucléotide en position +642 ;

20

- débutant au nucléotide en position +444 et se terminant au nucléotide en position +642 ;

25 - débutant au nucléotide en position +255 et se terminant au nucléotide en position +642 ; ou

- débutant au nucléotide en position +1 et se terminant au nucléotide en position +642.

30 14. Usage selon l'une quelconque des revendications 4 à 13, selon lequel la région promotrice minimale est issue du gène *adh* de *Schizosaccharomyces pombe*.

- 43 -

15. Usage selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, selon lequel ladite deuxième cassette d'expression est insérée dans un vecteur d'expression multicopie.
- 5 16. Usage selon la revendication 15, selon lequel ladite deuxième cassette d'expression est insérée dans un vecteur d'expression multicopie comprenant notamment ladite première cassette d'expression.
- 10 17. Usage selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, selon lequel une ou plusieurs copie(s) de ladite deuxième cassette d'expression sont insérées dans le génome d'une cellule hôte, ladite cellule hôte comprenant notamment une ou plusieurs copie(s) de ladite première cassette d'expression insérée(s) soit dans le génome de la cellule hôte soit dans un vecteur multicopie.
- 15 18. Cellule hôte dans laquelle on met en oeuvre un usage selon l'une des revendications 1 à 17.
19. Cellule hôte selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche de *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces sloofiae*,
20 *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus* et *Hasegawaea japonicus*.
20. Cassette d'expression comprenant un fragment d'ADN codant pour une protéine d'intérêt, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son
25 expression, lesdits éléments comportant une région promotrice régulable par la thiamine et issue du gène *pho4* de *Schizosaccharomyces pombe*.
21. Cassette d'expression selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite région promotrice est telle que définie selon l'une quelconque des
30 revendications 6 à 14.

- 44 -

22. Vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression selon la revendication 20 ou 21.
23. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle comprend une cassette d'expression
5 selon la revendication 20 ou 21 ou un vecteur d'expression selon la revendication 22.
24. Procédé de production d'une protéine d'intérêt par une cellule hôte selon l'une quelconque des revendications 18, 19 ou 23, selon lequel :
- 10
- on cultive dans un milieu approprié en absence de thiamine ladite cellule hôte ; et
 - on récupère ladite protéine d'intérêt.
- 15
25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la cellule hôte est une souche de *Schizosaccharomyces pombe*.

1 / 3

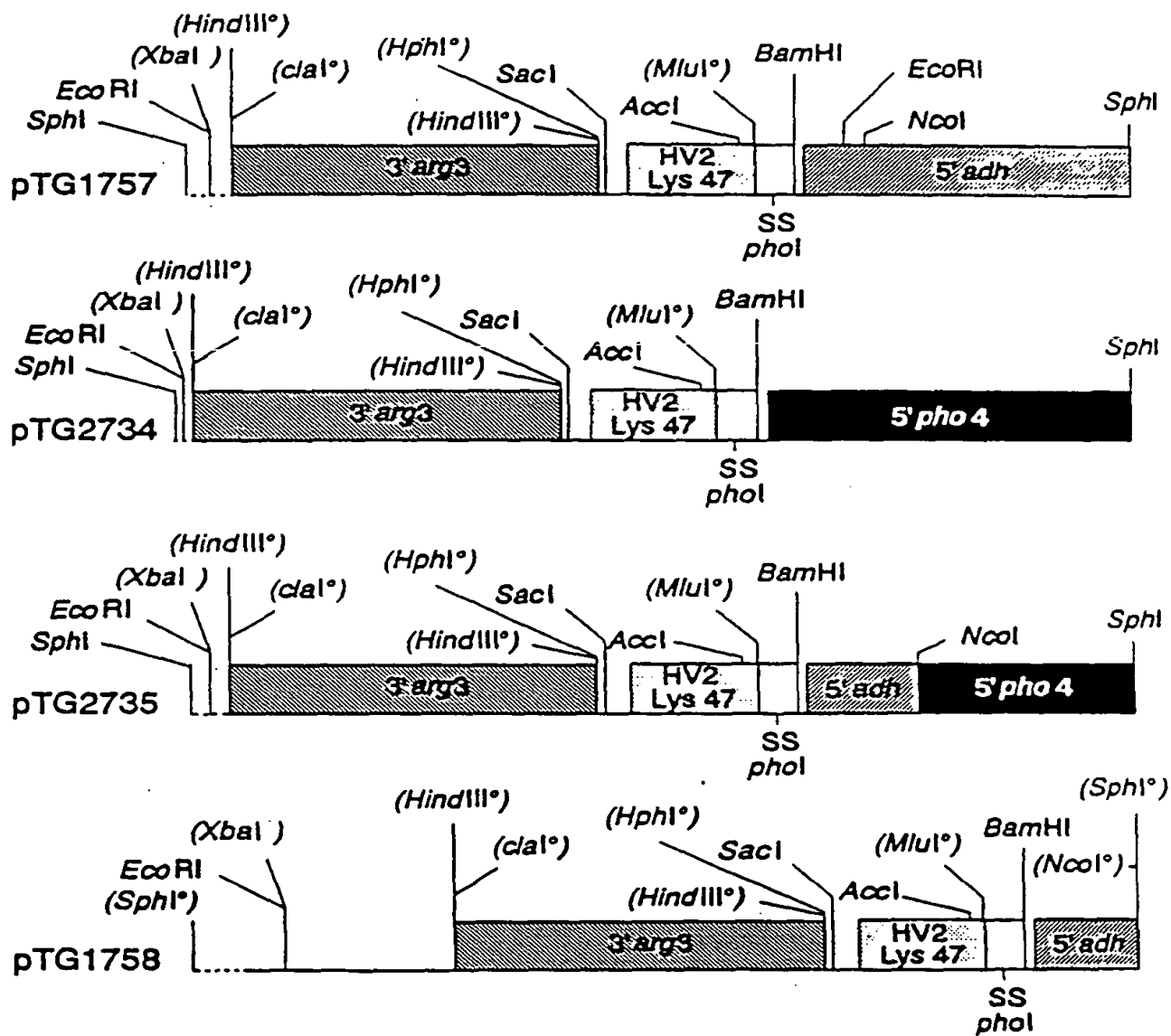


FIGURE 1

2/3

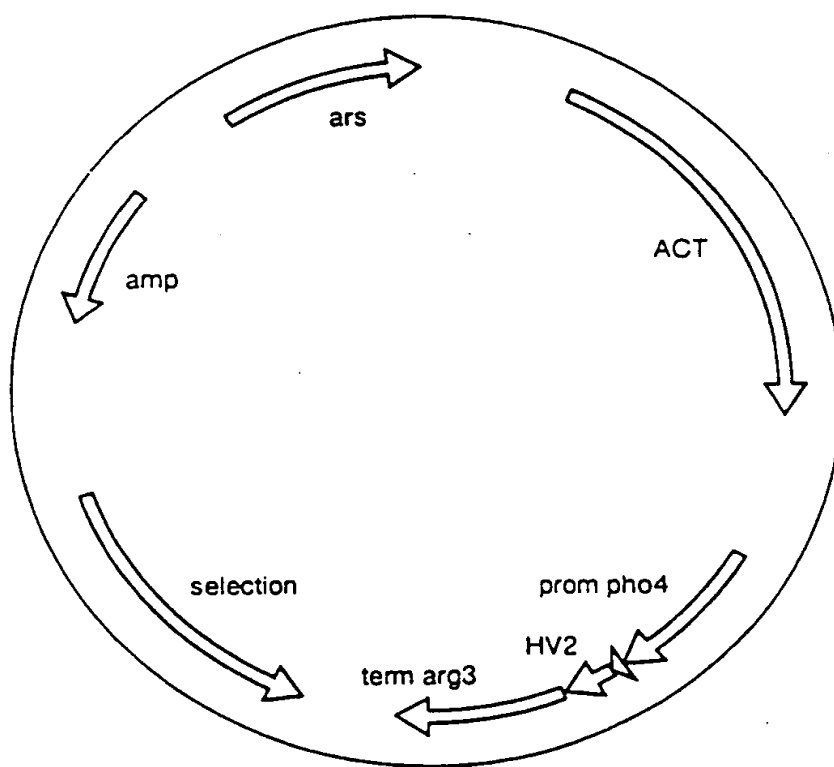


FIGURE 2

3/3

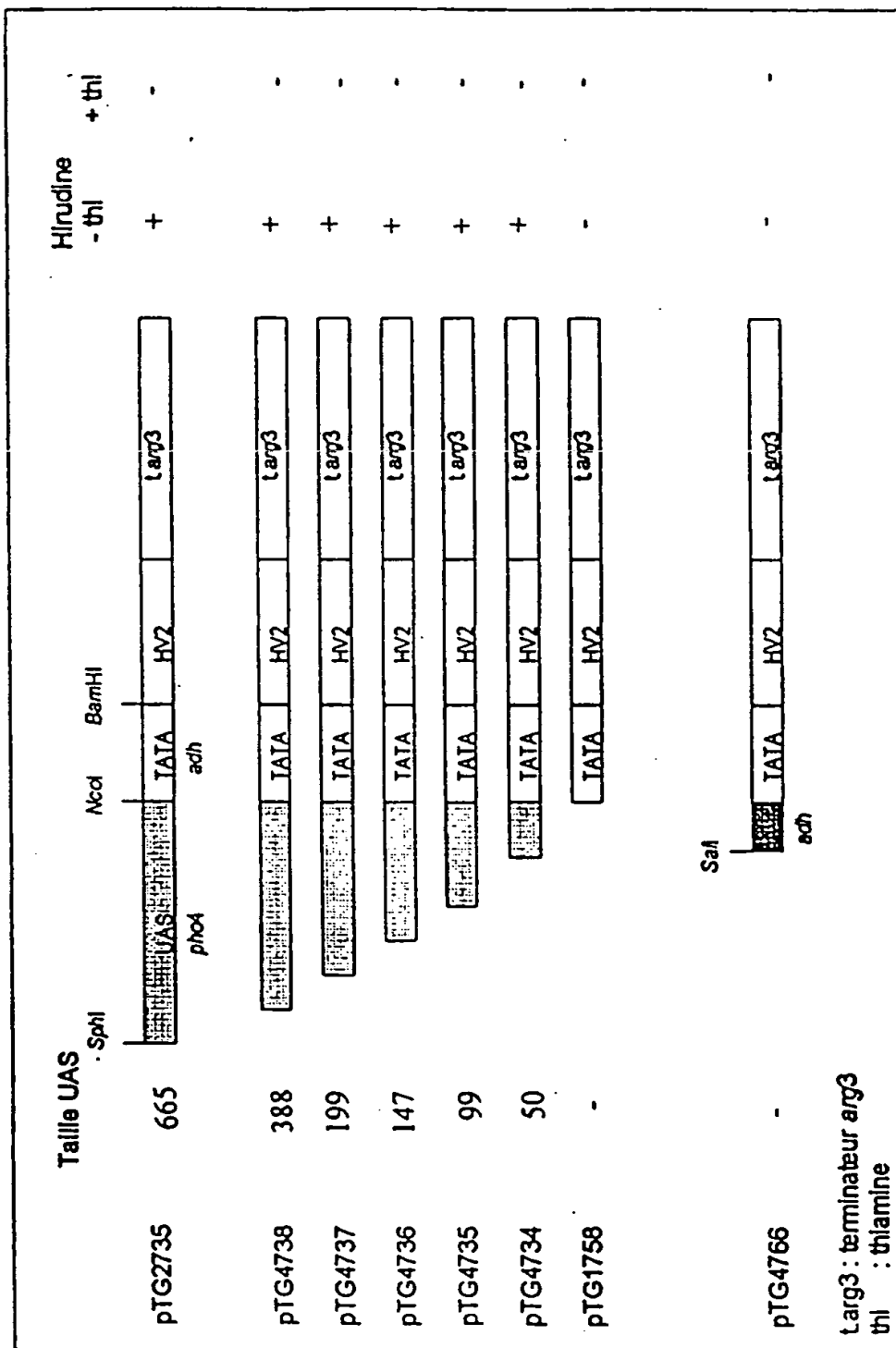


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 95/00269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/81 C12N1/19 //(C12N1/19,C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE EMBL X77512, 7 February 1994 H.FRANKHAUSER AND M.E.SCHWEINGRUBER 'Thiamine repressible genes regulatory protein TH11 (Transcription factor NTF1)' see abstract & JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994 MD US, pages 11921-11926, ---	1
P,Y	J. BIOL. CHEM. (1994), 269(16), 11921-6 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, April 1994 TANG, CAROL S. L. ET AL 'ntf1+ encodes a 6-cysteine zinc finger-containing transcription factor that regulates the nmt1 promoter in fission yeast' see the whole document ---	1

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1995

Date of mailing of the international search report

04.07.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/FR 95/00269

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9340 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-314182 & IT-B-1 236 844 (ITAL MIN UNIV RICERCA SCI TECNOLOGICA) , 22 April 1993 see abstract</p> <p>---</p>	1
Y	<p>FEBS LETT. (1992), 305(3), 244-8 CODEN: FEBLAL;ISSN: 0014-5793, NOSAKA, K. ET AL 'Upstream activation element of the PH03 gene encoding thiamin - repressible acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae' see the whole document</p> <p>---</p>	1
Y	<p>GENETICS (1992), 130(3), 445-9 CODEN: GENTAE;ISSN: 0016-6731, SCHWEINGRUBER, ANNE MARIE ET AL 'Isolation and characterization of regulatory mutants from Schizosaccharomyces pombe involved in thiamine -regulated gene expression' see the whole document</p> <p>---</p>	1
Y	<p>GENE (1993), 123(1), 127-30 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, MAUNDRELL, KINSEY 'Thiamin - repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast' see the whole document</p> <p>---</p>	1
Y	<p>FEBS LETTERS, vol. 297, no. 1,2, February 1992 AMSTERDAM NL, pages 155-158, HIROSHI NISHIMURA ET AL. 'Cloning and characteristics of a positive regulatory gene,THI2 (PH06), of thiamin biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae' see the whole document</p> <p>---</p>	1
P,Y	<p>J. BACTERIOL. (1994), 176(21), 6631-5 CODEN: JOBAAY;ISSN: 0021-9193, ZURLINDEN, ANDREAS ET AL 'Cloning, nucleotide sequence, and regulation of Schizosaccharomyces pombe thi4, a thiamine biosynthetic gene' see the whole document</p> <p>---</p>	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 95/00269

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	<p>GENE (1994), 147(1), 141-4 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, FANKHAUSER, HANS ET AL. 'Thiamine -repressible genes in Schizosaccharomyces pombe are regulated by a Cys6 zinc-finger motif-containing protein' see the whole document -----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00269

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/81 C12N1/19 //(C12N1/19, C12R1:645)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DATABASE EMBL X77512, 7 Février 1994 H.FRANKHAUSER AND M.E.SCHWEINGRUBER 'Thiamine repressible genes regulatory protein TH11 (Transcription factor NTF1)' voir abrégé & JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, 1994 MD US, pages 11921-11926,	1
P, Y	J. BIOL. CHEM. (1994), 269(16), 11921-6 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, Avril 1994 TANG, CAROL S. L. ET AL 'ntf1+ encodes a 6-cysteine zinc finger-containing transcription factor that regulates the nmt1 promoter in fission yeast' voir le document en entier	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>'&' document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
1	Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16 Juin 1995</div>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04.07.95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Delanghe, L</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00269

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9340 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 93-314182 & IT-B-1 236 844 (ITAL MIN UNIV RICERCA SCI TECNOLOGICA) , 22 Avril 1993 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
Y	<p>FEBS LETT. (1992), 305(3), 244-8 CODEN: FEBLAL;ISSN: 0014-5793, NOSAKA, K. ET AL 'Upstream activation element of the PH03 gene encoding thiamin - repressible acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
Y	<p>GENETICS (1992), 130(3), 445-9 CODEN: GENTAE;ISSN: 0016-6731, SCHWEINGRUBER, ANNE MARIE ET AL 'Isolation and characterization of regulatory mutants from Schizosaccharomyces pombe involved in thiamine -regulated gene expression' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
Y	<p>GENE (1993), 123(1), 127-30 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, MAUNDRELL, KINSEY 'Thiamin - repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
Y	<p>FEBS LETTERS, vol. 297, no. 1,2, Février 1992 AMSTERDAM NL, pages 155-158, HIROSHI NISHIMURA ET AL. 'Cloning and characteristics of a positive regulatory gene,THI2 (PH06), of thiamin biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
P,Y	<p>J. BACTERIOL. (1994), 176(21), 6631-5 CODEN: JOBAAY;ISSN: 0021-9193, ZURLINDEN, ANDREAS ET AL 'Cloning, nucleotide sequence, and regulation of Schizosaccharomyces pombe thi4, a thiamine biosynthetic gene' voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 95/00269

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,Y	<p>GENE (1994), 147(1), 141-4 CODEN: GENED6; ISSN: 0378-1119, FANKHAUSER, HANS ET AL 'Thiamine -repressible genes in Schizosaccharomyces pombe are regulated by a Cys6 zinc-finger motif-containing protein' voir le document en entier -----</p>	1

